REVUE SUISSE DE ZOOLOGIE
Tome 59, nº 1 — Mars 1952

Erzeugung von zell-letalen Schädigungsmustern bei Tritonkeimen durch ein Chloræthylamin (Nitrogen-Mustard)

(Kurze Mitteilung)

von

P. D. NIEUWKOOP
(Hubrecht Laboratorium, Utrecht, Holland.)
und
F. E. LEHMANN
(Zoophysiolog. Abt. des Zoolog. Instituts der Universität Bern, Schweiz.)

Mit 6 Textabbildungen und 3 Tabellen.

1. EINLEITUNG

Bodenstein und Mitarbeiter (1946-1948) haben an Amphibienkeimen den Einfluss von Nitrogen-Mustard-Verbindungen auf die spätere Entwicklung eingehend untersucht, besonders auf die Entwicklung der Haut und der Augen, in welch letzteren sich ein bestimmtes Degenerationsmuster auffinden liess. Tschumi (Bretscher und Tschumi 1951) befasst sich neuerdings mit der Beeinflussung der Beinentwicklung.

Eine physiologisch-chemische Untersuchung von Bodenstein und Kondritzer (1948) zeigt, dass die Nitrogen-Mustard-Verbindungen die Synthese der Desoxyribonucleinsäure blockieren, jedoch die Synthese der Ribonucleinsäure nicht beeinflussen. Aus den Versuchen Brachets ergaben sich nun zahlreiche Hinweise auf die Bedeutung der Nukleinsäuren für die ersten Phasen der Morphogenese, insbesondere der neuralen Induktion. Wir stellten uns daher die Aufgabe, zu untersuchen, wie eine Nitrogen-Mustard-Verbindung, das Methyl-bis-β-Chloraethylamin (MBA) die Früh-

stadien der Morphogenese der Amphibien beeinflusst. Da wir uns zunächst der Analyse der histologisch fassbaren Störungen zuwandten, können wir in dieser Mitteilung nur ein Bild der aufgefundenen, regional- und phasenspezifischen „Schädigungsmuster" geben und verzichten deshalb vorerst darauf, die Störungen im Nukleinsäuregehalt zu behandeln. Das Schädigungsmuster zeigt in manchen Punkten eine auffallende Aehnlichkeit mit demjenigen mancher kernletaler *Amphibienkeime* (Bastardmerogone und diploide Bastarde. Baltzer, Hadorn, u.a.). Deshalb möchten wir hier auch auf die Erscheinung der selektiven Letalität, bewirkt durch ein Nitrogen-Mustard, eingehen.

2. METHODEN

In allen Versuchen wurde eine Reihe verschiedener Entwicklungsstadien der chemischen Behandlung unterworfen um ev. phasenspezifische Effekte festzustellen. Die ersten an *T. alpestris*-Keimen in Bern angestellten Versuche (1947) liessen solche Effekte vermuten. Doch ergab sich später, dass die Verwendung der Lehmannschen Lösung, die ein hohes pH hat, gewisse Reaktionen vorgetäuscht hatte, weil das N-Mustard in der damals verwendeten Lösung zum Teil vorzeitig hydrolysiert worden war [1]. Nach dieser Feststellung hat Nieuwkoop mit einigen Schülern [2] die Experimente mit neutralen Lösungen in Utrecht im Laufe des Frühlings 1949 an *T. taeniatus* wiederholt. Die Ausarbeitung des Materials wurde erst im Frühling 1951 vorgenommen.

Während in den ersten Serien mit *T. alpestris* Konzentrationen von 1-2 . 10^{-4} benutzt wurden, zeigte sich das *T. taeniatus*-Material bedeutend empfindlicher, sodass in diesen Serien immer mit einer Konzentration von 4.10^{-5} gearbeitet wurde. Die *Tr. taeniatus*-Keime wurden mit neutraler Lösung in den meisten Fällen während 45 Minuten und in einigen Fällen nur während 20 Minuten behandelt.

3. REAKTIONEN AUF DIE MBA-BEHANDLUNG

a) *Phasenspezifische Veränderung des Schädigungsmusters.* In den beigegebenen Tabellen findet sich eine Uebersicht der Schä-

[1] In dieser Hinsicht muss die kurze Mitteilung von Nieuwkoop auf dem Zoologen-Kongress in Paris 1948 korrigiert werden.

[2] Die experimentellen Serien wurden ausgeführt von P. van Oordt und E. A. Mennega.

digungsmuster, wie sie nach Behandlung der verschiedenen Stadien auftraten.

Die Stadien der Frühentwicklung lassen sich nach ihrer Reaktion auf das MBA in drei verschiedene Gruppen zusammenfassen.

Tabelle 1.

Einstellung der Entwicklung während der Gastrulation oder der Neurulation. (Gruppe 1.)

(Stadienbezeichnung nach Harrison-Rotmann, s. Lehmann 1945.S.151.)

Behandeltes Stadium	Anzahl der Keime	Entwicklungsstörungen
Grobzellige Blastula [1] (Stad. 7)	4	Völlige Blockierung der Entwicklung, ausnahmsweise Andeutung eines Urmundgrübchens.
Mittlere Blastula [1] (Stad. 8)	12	Idem.
Feinzellige Blastula [1] (Stad. 8+)	17	Idem, in einem Falle Entwicklung bis zum sichelförmigen Urmund.
Junge Gastrula [1] (Stad. 10)	12	In den meisten Fällen sehr schwache Entwicklung mit völliger Blockierung auf dem mittleren Gastrulastadium. In einzelnen Fällen mehr oder weniger normale Weiterentwicklung, Bildung einer verkleinerten Neuralplatte, spätere Degeneration.
Gastrula mit sichelförmigem Urmund (Stad. 10—11 *a*)	15	In vielen Fällen wird die Morphogenese auf Dotterpfropfstadien oder schon früher blockiert; mehrere Keime entwickeln sich weiter und gehen erst später auf dem Schwanzknospenstadium zugrunde.

[1] Nach einer Behandlung von 20 Minuten zeigen die Keime dieselben Abnormitäten.

Die erste Gruppe umfasst die Stadien von der jungen Blastula bis zur Gastrula mit sichelförmigem Urmund. Schon nach einer Behandlung von 20 Minuten war die Entwicklung in den meisten Fällen völlig blockiert. Eine Urmundgrube konnte sich noch bilden und vielleicht

etwas vertiefen, aber eine weitere Entwicklung fand in den meisten Fällen nicht statt. Nach ein bis zwei Tagen zerfiel das ganze Ekto- und Mesoderm. Das Entoderm, das offenbar weniger empfindlich ist, blieb zunächst noch als Ganzes erhalten, ging aber schliesslich ebenfalls nach einigen Tagen zugrunde. Behandelte junge Gastrulae konnten sich in einzelnen Fällen noch ziemlich weit entwicklen. Der Urdarm invaginierte mehr oder weniger normal und eine kleine Neuralplatte bildete sich.

Tabelle 2.

Einstellung der Entwicklung während der Embryobildung.
(Gruppe 2.)

(Stadienbezeichnung wie Tab. 1.)

Behandeltes Stadium	Anzahl der Keime	Entwicklungsstörungen
Gastrula mit hufeisenförmigem Urmund (Stad. 11 *b*)	17	In verschiedenen Fällen Morphogenese noch blockiert; stärkere Tendenz zu einer weiteren Entwicklung, verzögerte Bildung einer mehr oder weniger stark verkleinerten Neuralplatte; in allen Fällen bleibt der Dotterpfropf teilweise aussen, weil sich das ventrale Mesoderm nicht einrollt; Streckung der Larve anfänglich ziemlich normal; Schwanzknospe reduziert ebenso wie die äusseren Kiemen und der Flossen saum; Herz und Blutinseln sehr kümmerlich entwickelt.
Gastrula mit grossem Dotterpfropf (Stad. 12 *a*)	14	Idem; vielleicht etwas bessere Entwicklung. Sehr unregelmässige Verteilung der Pigmentzellen. Invagination des Entoderms vollkommen.
Gastrula mit kleinem Dotterpfropf (Stad. 12 *b*)	13	Idem; verschiedene Reduktionsstufen der Neuralplatte.
Gastrula mit spaltförmigem Urmund (Stad. 13)	15	Neuralplattenbildung teilweise vom Anfang an reduziert, teilweise normal. In der zweiten Gruppe Auflösung des Nervensystems auf späteren Stadien (zwei bis vier Tage nach Behandlung). Aeussere Merkmale der späteren Entwicklung wie in vorigen Stadien.

TABELLE 3.

Entwicklung geht bis zur Histogenese.
(Gruppe 3.)

(Stadienbezeichnung wie Tab. 1.)

Behandeltes Stadium	Anzahl der Keime	Entwicklungsstörungen
Rückenrinnen-Stadium (Stad. 13)	28	Erste Entwicklung normal oder nur gehemmt. Reduktion des Nervensystems erst nach fünf bis sechs Tagen. Spätere Entwicklung wie in den vorigen Stadien. Oedematöse Aufschwellung der Perikardhöhle.
Junge Neurula (Stad. 15)	37	Degeneration der Blutinseln schon nach zwei Tagen ebenso wie die Degeneration des Herzens. Keine Blutzirkulation. Reduktion des Nervensystems und der Neuralleistenderivate erst nach vier bis sechs Tagen. Starke Rücken- und Schwanzkrümmung. Abnormitäten weniger stark als im vorigen Stadium.
Mittlere Neurula (Stad. 16—17)	25	Idem. Stark wechselnde Reduktionserscheinungen, welche auf verschiedenen Alterstadien anfangen. Starke Rücken- und Schwanzkrümmung.
Neurula mit geschlossenen Wülsten (Stad. 19)	14	Idem.
Augenblasenstadium (Stad. 20—21)	7	Vier bis sechs Tage nach Behandlung erstes Auftreten der äusserlich sichtbaren Symptome der Degeneration. Starke Reduktion der Augen. Ein Teil der Keime mit schwacher Blutzirkulation und Herzkontraktion.
Junges Schwanzknospenstadium (Stad. 25—26)	3	Nervensystem wahrscheinlich ziemlich wenig angegriffen mit Ausnahme der Augen, Kiemen und Haftfäden schlecht entwickelt, ebenso wie die Pigmentzellen. Etwas bessere Blutzirkulation.
Aelteres Schwanzknospenstadium (Stad. 30—32)	7	Bessere Blutzirkulation, Kiemen schwach entwickelt. Schwache Rückenkrümmung, Starke Reduktion der Augen.

Die zweite Gruppe umfasst die Stadien bis zur vollendeten Gastrula mit spaltförmigem Urmund. Hier trat äusserlich erst eine scheinbar normale Entwicklung auf, da die Gastrulation nicht gestört wurde. Die Bildung der Neuralplatte war jedoch stark verzögert, sie erschien als diffuser Bereich, welcher sich allmählich kontrahierte und eine flache, stark verkürzte und verschmälerte Neuralplatte bildete. Diese Platte konnte sich in einzelnen Fällen noch weiter reduzieren. Schliesslich schloss sie sich stark verspätet als schmale und flache Grube. Die sich entwickelnde Larve zeigte starke Störungen. Das Nervensystem war stark reduziert, der Kopf sehr verschmälert, der Rücken oft gekrümmt und der Schwanz stark verkürzt und oft unregelmässig gebildet. In späteren Phasen fand sich eine stark gehemmte Entwicklung der äusseren Kiemenäste und der Kiemenbogen; das Herz war rudimentär und die Blutinseln fehlten meistens völlig [1]. Die Rückenflosse war fast völlig unterdrückt und die Chromatophoren waren — in geringer Anzahl — in abnormen Muster über die ganze Flanke verbreitet. Die Schwanzflosse fehlte auch zum grösstem Teil, während die Schwanzachse stark verkümmert und unregelmässig aussah.

In der dritten Gruppe (Neurula- bis Schwanzknospenstadium) war die Entwicklung anfänglich ungestört. Die Neuralplatte schloss sich normal und die erste Differenzierung des Zentralnervensystems fand normal statt. Später trat dann jedoch eine starke Degeneration des Nervensystems und der Neuralwülste auf, während auch die Schwanzknospe stark angegriffen wurde. Die Blutinseln entwickelten sich in den meisten Fällen gar nicht und das Herz blieb rudimentär. Die Pericardhöhle war manchmal sehr angeschwollen. Die äusseren Kiemen waren stark reduziert, ebenso die Haftfäden. Dem Rücken und Schwanz entlang war der Flossensaum stark verkleinert und waren die Pigmentzellen oft unregelmässig verteilt. Die Augen waren auch sehr erheblich reduziert. Die älteren Stadien nach Verschluss des Neuralrohrs waren im allgemeinen weniger empfindlich, zeigten jedoch eine starke Reduktion der Augen.

---

[1] Bei *T. alpestris* waren die Blutinseln etwas weniger empfindlich und entwickelten zunächst eine geringe Anzahl Blutzellen, welche jedoch später zugrunde gehen konnten.

b) *Histologische Kennzeichnung des Schädigungsmusters.* Nach Behandlung der e r s t e n G r u p p e (Tabelle 1), in welcher die Keime sehr empfindlich auf die MBA-Einwirkung sind, trat eine starke Desintegration des präsumptiven Ekto- und Mesoderms auf. Nach 24 Stunden war die ganze Blastocoelhöhle mit runden ekto- und mesodermalen Zellen angefüllt und die Wand sehr dünn geworden. Die Oberflächenschicht des Keimes war intakt, während



Abb. 1.

Auflösung der jungen Neuralplatte nach starker MBA—Wirkung. Lokale Auflösung des Oberflächenfilms (S) (Surface coat). Y.M.: Dottermembran (yolk membrane). Schraffierte Zellen mit oder ohne schwarze Kerne: nekrotisierende Zellen der Neuralplatte. Vergrösserung ± 160 x.

die ihr zugehörende Zellschicht an vielen Stellen unterbrochen schien. Die noch anhaftenden Zellen waren ganz flach ausgezogen. Das Entoderm bildete hingegen noch eine grosse einheitliche Zellmasse im zentralen und basalen Bereiche des Keimes. Die Keime dieser Gruppe, welche sich etwas weiter entwickelten, zeigten eine mehr oder weniger normale Invagination des Urdarms und eine erste Differenzierung einer Neuralplatte in normaler Ausdehnung. Die Degeneration trat hier erst etwas später auf.

Nach Behandlung d e r z w e i t e n G r u p p e (Tabelle 2) verlief die Entwicklung etwas anders. Die Gastrulation, welche schon mehr oder weniger weit fortgeschritten war, ging in normaler Weise weiter, nur konnte die Einrollung des ventralen Mesoderms verzögert oder sogar blockiert sein, was zusammenhängt mit der Degeneration der zukünftigen Blutzellen, die offenbar sehr empfindlich sind. Der Dotterpfropf blieb deswegen teilweise aussen, so dass sich später eine Analfistel bildete. Die Urdarmhöhle breitete sich

normal aus und erreichte in vielen Fällen ungefähr die gleiche Ausdehnung wie im normalen Keim. Die Neuralplatte wurde normal angelegt als eine Verdickung des Ektoderms und hatte auch die normale Ausdehnung, jedenfalls nach mässiger Einwirkung. Beim Anfang der Neuralplattenbildung und der Erhebung der Neuralwülste trat jedoch eine starke Reaktion auf. Die Zellen der künftigen

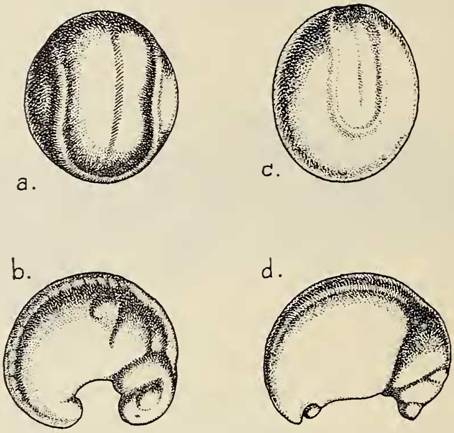


Abb. 2.

Äussere Gestalt einiger *Triton alpestris* Keime. *a*) Normale Neurula, *b*) Normales Schwanzknospenstadium, *c*) Mit MBA behandelter Keim (Neurula-Stadium), *d*) Idem (Schwanzknospenstadium). Vergrösserung ± 16 x.

Neuralplatte schieden massenhaft aus dem Zellverband aus, nachdem sie sich vom Oberflächenfilm des Keimes gelöst hatten (Abb. 1). Diese Reaktion fing im vorderen Teil der Neuralplatte an, wo die Morphogenese auch im Normalkeim zuerst sichtbar wurde. Der Oberflächenfilm kontrahierte sich wie im normalen Keim, so dass die Neuralplatte allmählich zusammenschrumpfte, ohne dass die Neuralwülste sich erheben konnten (Abb. 2). Das Material der Neuralwülste erschien ebenfalls stark angegriffen zu sein. Die Reduktion der Neuralplatte fand statt, ohne dass das Urdarmdach sich wesentlich veränderte. Es verkürzte sich vielleicht ein wenig, so dass die Strukturen der Neuralplatte und des Urdarmdaches topographisch wieder ungefähr übereinstimmten.

Bei weniger starken Reaktionen wurden die ausgestossenen Zellen, welche nach kurzer Zeit zu nekrotisieren begannen, durch

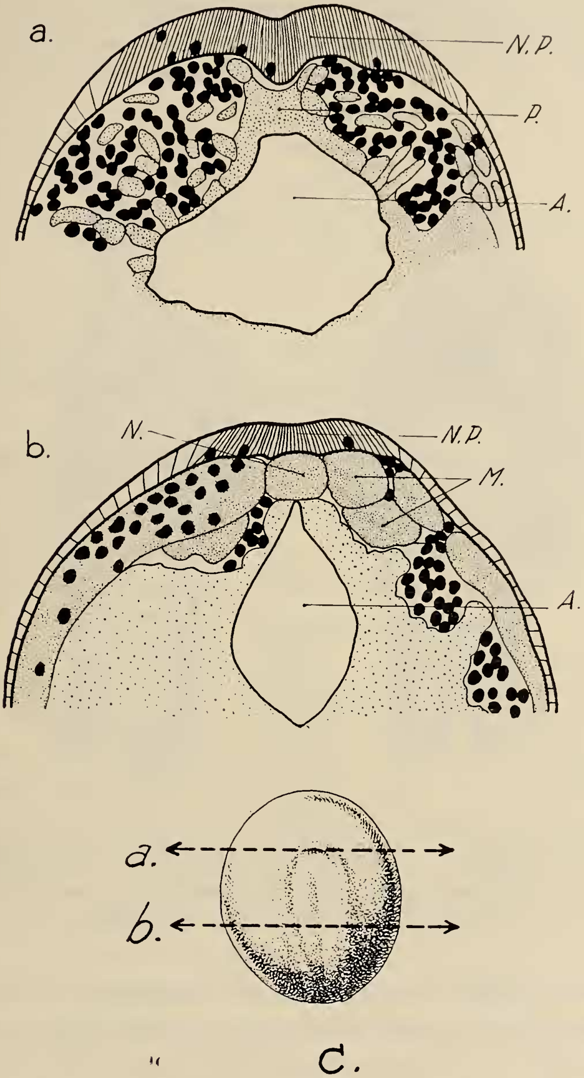


Abb. 3.

Querschnitte durch eine Neurula von *Triton taeniatus* nach mässiger MBA Einwirkung. *a*) Prächordales Niveau, *b*) Chordales Niveau, *c*) Aeussere Gestalt der Neurula. Schwarze Zellen = nekrotisierende Zellen der Neuralplatte. A.: Archenteron, M.: Ursegment (myotome), N.: Chorda (notochord), N.P.: Neuralplatte (neural plate), P.: Prächordalplatte (prechordal plate). Vergrösserung *a* und *b* ± 80 x, *c* ± 12 x.

das Mesoderm hindurch transportiert zur zentralen Entodermmasse, wo sie im Blastocoel und kleineren Höhlen angehäuft wurden (Abb. 3). Die Zellen drangen wegen der Resistenz des Oberflächenfilms nicht in die Urdarmhöhle ein. Das Mesoderm des Urdarm-

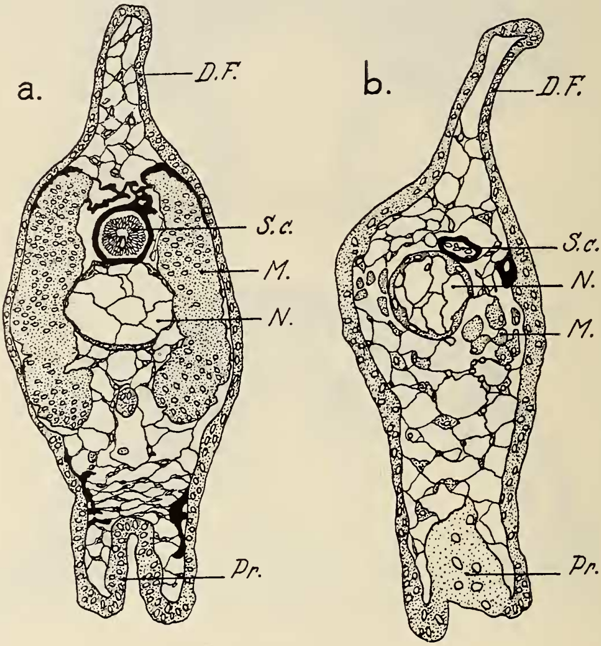


Abb. 4.

Querschnitte durch die Schwanzregion einer normalen (*a*) und einer mit MBA behandelten Larve (*b*) nach längerer Aufzucht. D.F.: Rückenflosse (dorsal fin), M.: Ursegment (myotome), N.: Chorda (notochord), Pr.: Proctodaeum, S.c.: Rückenmark (spinal cord). Vergrösserung ± 80 x.

daches fing nachher wieder an, sich zu reorganisieren und bildete eine Chorda mit zwei mehr oder weniger regelmässigen Reihen von Ursegmenten. Die Nekrose beschränkte sich nicht nur auf die Neuralplatte, sondern das Material der Neuralwülste wurde ebenfalls getroffen. Die überlebenden Zellen begannen zu wandern und bildeten die entsprechenden Organe sehr mangelhaft, wie Ganglien, Korium, Pigmentzellen, Flossensaum, die mesektodermalen Teile der Kiemenäste, den Knorpel des Splanchnokraniums u.s.w. Das Rückenmark des Schwanzes und die Schwanzmyotome, welche beim

Normalkeim aus dem hinteren Bereich der Neuralplatte stammen, waren auch stark reduziert (Abb. 4), während sich die Schwanzchorda ziemlich normal entwickelte, sich aber mangels angrenzendem Mesoderm stark krümmte.

Bei starker Reaktion — insbesondere nach längeren Behandlungsperioden oder höheren Konzentrationen — traten auch Störungen im Bereiche des Urdarmdaches auf (Abb. 5). Das Mesoderm wurde angegriffen und die Reduktion schritt von ventral nach dorsal weiter, griff also zuerst das ventrale und laterale Mesoderm an, darauf das dorso-laterale Mesoderm der zukünftigen Ursegmente und erste zuletzt die Chorda und vielleicht auch die Prächordalplatte. Zu gleicher Zeit wurde auch die Epidermis sehr stark beeinflusst, so dass nach kurzer Zeit die obere Zellschicht sehr dünn angezogen wurde. Wahrscheinlich vollzieht sich die Reduktion in der Epidermis in dorso-ventraler Richtung, wobei die dorsale, an der Neuralplatte angrenzende Epidermis die höchste Empfindlichkeit zeigt. Der Oberflächenfilm des Keimes ging oft lokal zugrunde, worauf die nekrotisierenden Zellen austraten. Schliesslich blieben in diesen Fällen nur das Entoderm, Teile der Chorda und eine ganz dünne Epidermischicht zurück.

Die weitere Entwicklung dieser Keime zeigten noch einige wesentliche Merkmale. Die Reduktion des Zentralnervensystems war nicht regional-spezifisch, sondern vollzog sich ziemlich gleichmässig. Das Nervensystem wurde über seine ganze Länge angegriffen; die zurückbleibenden Zellen organisierten, solange dazu das Material ausreichte, ein kompletes Nervensystem (Abb. 6 *b* und 6 *c*). Bei starker Reduktion war nur der Grundplan erkennbar, während einzelne Organe wie die Augen offenbar nicht mehr angelegt werden konnten (Abb. 6 *d*). Schliesslich war das ganze Nervensystem zu einer dünnen Röhre reduziert, deren Wand aus einem einschichtigen ependymähnlichen Epithel bestand. Dieser Schlauch konnte sich noch lokal zu einem sehr dünnen Strang reduzieren, welcher schliesslich auch teilweise fehlen konnte. So war dann an verschiedenen Stellen überhaupt kein Nervensystem mehr vorhanden. Diese letzte Störung beruht wahrscheinlich auf der Tendenz des Materials, sich wenn möglich lokal zu konzentrieren. Im Kopf fand sich in den extremen Fällen manchmal ein isoliertes oder nur strangförmig verbundenes Pro-, Mes- und Rhomb-encephalen (Abb. 6 *d*).

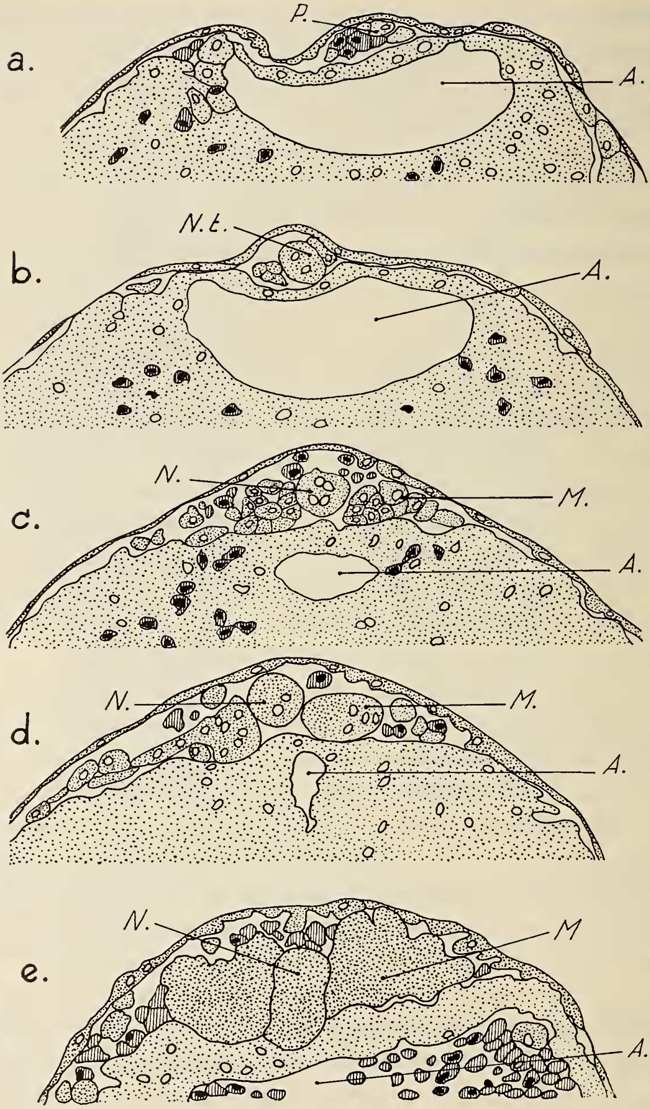


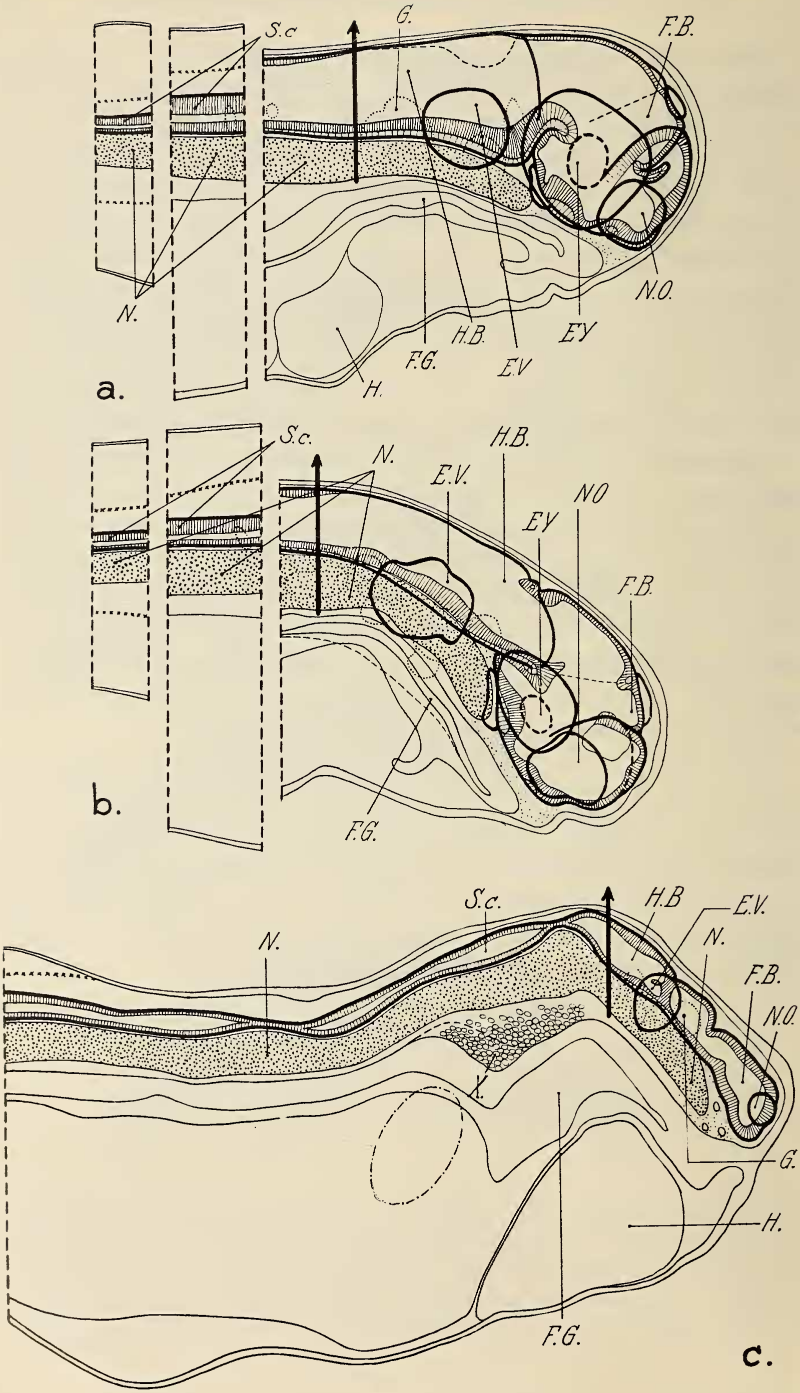
Abb. 5.

Querschnitte durch eine Larve von *T. alpestris* nach starker MBA—Einwirkung. *a*) Prächordales Niveau, *b*) Chorda-Spitze, *c*) hintere Kopfregion, *d*) Rumpfregion, *e*) Schwanzniveau. Schraffierte Zellen mit oder ohne schwarze Kerne = nekrotisierende Zellen des Nervensystems. A.: Archenteron, M.: Ursegment (Myotome), N.: Chorda (notochord), N.t.: Chorda Spitze (tip of notochord), P.: Prächordale Platte (prechordal plate). Vergrösserung ± 80 x.

Die frühe Degeneration des ventralen Mesoderms — der zukünftigen Blutinseln — führte in den *Triton taeniatus*-Keimen oft zur Bildung einer weiten Analfistel.

Nach Behandlung der dritten Gruppe (Tabelle 3) traten ungefähr die gleichen Störungen auf, nur war die Latenzperiode länger. Sie dauerte mehrere (4—6) Tage. Das Material des Zentralnervensystems und der Neuralwülste zeigte starke Nekrosen, während auch die Blutinseln stark angegriffen wurden. Die degenerierenden Zellen des Zentralnervensystems häuften sich im Gegensatz zur zweiten Phase im zentralen Lumen des Nervensystems an, da offenbar der Oberflächenfilm sich während des Verschlusses des Neuralrohrs geändert hatte. Es bildete sich ein wurstförmiger, normal proportionierter Schlauch, welcher mit einer sehr dünnen, oft einschichtigen Zellschicht bekleidet war, die einen ependymähnlichen Charakter aufwies. Diese Wand zerriss meistens nach einigen Tagen lokal, der Inhalt häufte sich unter dem Ektoderm in Form grosser Blasen an und wurde schliesslich, zusammen mit dem degenerierten Neuralwulstmaterial ausgestossen. Mit Ausnahme des ventralen Mesoderms der Blutinseln wurde das Mesoderm, dass sich schon ziemlich weit differenziert hatte, sehr wenig von der chemischen Behandlung direkt beeinflusst.

Als allgemeine Folge der Behandlung wurde in allen drei Phasen in allen Keimblättern die mitotische Aktivität stark herabgesetzt. Während der Behandlung häuften sich die Mitosen meistens in der Ana- und Telo-phase an. Nachher war die Anzahl der Mitosen stark verringert, die Zellen blieben sehr gross, so dass die ganze Struktur der Larven einen groben Eindruck machte.



S.c
G.
F.B.
N.
N.O.
EY
H.B.
E.V
F.G.
H.
a.
S.c.
N.
H.B.
E.V.
NO
EY
F.B.
F.G.
b.
S.c.
H.B
E.V.
N.
F.B.
N.O.
X.
G.
H.
F.G.
c.

Abb. 6.

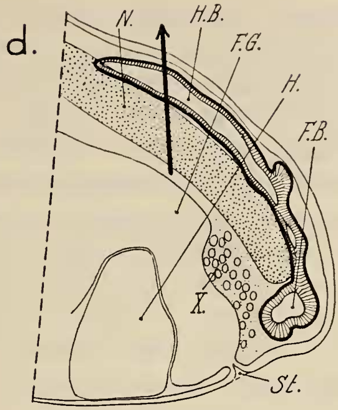


Abb. 6.

Graphische Rekonstruktionen einiger *T. alpestris* Larven. *a*) Normale Larve, *b—d*) Mit MBA behandelte Larven mit steigender Reduktion des Zentralnervensystems. Projektion auf die sagittale Ebene. Die Figuren *a* und *b* mit normalem Rumpf- und Schwanzsektor. Vergrösserung 50 x. E.V.: Ohrblase (ear vesicle), EY: Auge (eye), F.B.: Vorderhirn (forebrain), F.G.: Vorderdarm (foregut), G.: Ganglia, H.: Herz (heart), H.B.: Hinterhirn (hindbrain), N.: Chorda (notochord), N.O.: Riechgrube (nasal organ), S.c.: Rückenmark (spinal cord), S.t.: Stomodaeum, X.: angehäufte nekrotische Zellen des Nervensystems (necrotic cells of the central nervous system). Der Pfeil gibt die Lage der Kopf- Rumpfgrenze.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Das Reaktionsvermögen des MBA ist sehr gross und die chemische Reaktion geht sehr schnell vor sich, so dass eine kurze Einwirkung schwacher Konzentrationen schon ausreicht, um die Entwicklung weitgehend zu beeinflussen.

Wenn man die drei verschiedenen Phasen miteinander vergleicht, sind die Unterschiede erheblich, besonders zwischen der ersten und zweiten Phase. Die präsumptiven ektodermalen und mesodermalen Bezirke der Blastulae und jungen Gastrulae sind sehr empfindlich. Es gehen zahlreiche Zellen zugrunde. Der Keim kann die morphogenetischen Bewegungen wegen Mangel an Zellmaterial nicht mehr ausführen. Die Tendenz dazu besteht noch; ein Anfang der Gastrulation wurde öfters beobachtet. In der zweiten Phase ist die Empfindlichkeit des Keimes schon stark eingeschränkt. Das präsumptive Nervensystem und die Blutinseln sind viel empfind-

licher als das präsumptive Ektoderm und das Mesoderm des Urdarmdaches. Nur bei sehr starker Reaktion tritt auch eine Nekrose der Epidermis und des Mesoderms auf. Die verschiedene Empfindlichkeit der mesodermalen Teile findet vielleicht ihre Erklärung im gestuften Entwicklungszustand der verschiedenen Teile. Die Chorda differenziert sich als erste, dann folgen die Ursegmente und schliesslich das nephrogene Material und die Seitenplatte. Ob die Epidermis auch ein Empfindlichkeitsgefälle zeigt, ist noch nicht ganz klar; wohl findet man die Degeneration hauptsächlich an der dorsalen Seite, wo die Epidermis, in dorsaler Konvergenz begriffen, sich zusammenschiebt. In der dritten Phase ist die Empfindlichkeit noch weiter beschränkt, und es werden ausschliesslich das Zentralnervensystem, die mesektodermalen Derivate und die Blutinseln letal.

Die stark betroffenen Keimteile repräsentieren im allgemeinen diejenigen Bereiche, welche eine starke mitotische und eventuell morphogenetische Aktivität aufweisen oder vorbereiten. Die Neuralplatte ist der aktivste Teil des Ektoderms, in dem neben einer starken Häufung der Mitosen auch gewisse Stoffwechselvorgänge (Nukleinsäureumsatz) erhöht sein dürften (Brachet 1947). Die präsumptiven Blutinseln sind ebenfalls in starker Zellteilung begriffen. Gerade in solchen Blastemen mit erhöhter mitotischer Aktivität und wahrscheinlich auch erhöhtem Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel, könnte eine Blockierung der Synthese der Thymonukleinsäure irreversible Schädigungen zur Folge haben, da es vermutlich bei aktiveren Funktionszuständen viel rascher zur Ausbildung eines beschränkenden Faktors kommt. Das MBA greift vermutlich in generelle Prozesse des Stoffwechsels ein, da mehrere Blasteme zu gleicher Zeit geschädigt werden und nur graduelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der verschiedenen Organblasteme auftreten — bei stärkerer Einwirkung werden mehrere Teile in steigendem Masse angegriffen — und schliesslich ist keine regionalspezifische Degeneration des Nervensystems mehr zu beobachten. Die charakteristische Empfindlichkeit des präsumptiven Neuralplattenbezirkes tritt erst auf dem hufeisenförmigen Urmundstadium auf, wenn das Ektoderm lokal in Kontakt mit dem Urdarmdach gekommen ist. Es scheint also die Empfindlichkeit durch das einsetzende Induktionsgeschehen

verändert zu werden. In jüngeren Stadien sind die verschiedenen Bezirke der Epidermis noch in gleichem Masse empfindlich.

Die wenigen jungen Gastrulae, die sich nach der Behandlung weiter entwickeln, zeigen eine fast normale Einrollung des Ento- und Mesoderms. Die Urdarmhöhle breitet sich normal aus und das dorsale Urdarmdach induziert eine Neuralplatte im darüberliegenden Ektoderm, die eine nahezu normale Ausdehnung hat. Später setzt die Degeneration ein und der Keim geht meistens rasch zugrunde. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass die MBA-Behandlung die Induktion der Neuralplatte nicht wesentlich beeinflusst hat. Diese Tatsache stimmt überein mit den Vorstellungen BRACHET's über die wichtige Rolle, welche die Ribonucleinsäure bei der Induktion spielen soll, und deren Synthese nach BODENSTEIN und KONDRITZER (1948) nicht beeinflusst wird. Es ist jedoch zuzugeben, dass auch andere Erklärungen möglich sind.

Interessant ist die Tatsache, dass in allen drei Phasen das Entoderm, das auch in den experimentellen Untersuchungen HOLTFRETER's eine schon sehr ausgeprägte Tendenz zur Selbstdifferenzierung aufweist, sehr unempfindlich ist für das MBA.

Die Ausstossung der nekrotisierenden Zellen der Neuralplatte beginnt im vorderen Teil der Platte, wo auch die Formbildung zuerst sichtbar wird. Die Neuralwülste erheben sich hier am ersten. Möglicherweise können die Zellen die Formveränderungen zu palissaden- und flaschenförmigen Zellen nicht mehr vollziehen, lösen sich vom Oberflächenfilm ab und gleiten aus dem Zellverband heraus.

Die kümmerliche Entwicklung der äusseren Kiemenäste und inneren Kiemenbogen findet ihre Erklärung in der starken Degeneration der Zellen der Neuralleiste. Die Organe werden angelegt, können sich jedoch nur sehr unvollkommen differenzieren, da zu wenig Zellmaterial vorhanden ist. Dasselbe gilt für die Spinalganglien, das Korium, die Chromatophoren und den Flossensaum. Im Schwanz sind die Verhältnisse etwas verschieden. Hier ist die Chorda im Gegensatz zu den Ursegmenten und dem Nervensystem ziemlich normal entwickelt. Sie beginnt sich zwar zu strecken, hat jedoch zu wenig Umhüllungsmaterial und krümmt sich sehr unregelmässig.

Die sehr gehemmte Entwicklung des Herzens erfordert noch eine Erklärung. Obwohl keine direkten Beweise vorhanden sind,

sieht es doch sehr danach aus, als ob die Degeneration der Blutinseln die wirkliche Ursache wäre. Das Herz wird mehr oder weniger normal angelegt, entwickelt sich jedoch nicht zu einem hohlen Schlauch, sondern bildet einen kontraktilen Strang. Eine Blutzirkulation bleibt in den meisten Fällen völlig aus.

Bemerkenswert ist schliesslich die grosse Variabilität der Ergebnisse. Die einzelnen Eier sind sehr verschieden empfindlich, auch bei Behandlung auf demselben Stadium. Wie bei vielen anderen biologischen Reaktionen auf äussere Einflüsse ist auch hier das Reaktionsvermögen der einzelnen Eier auf das MBA verschieden. Demselben Phänomen begegnet man auch innerhalb der einzelnen Organsysteme. Die einzelnen Zellen der Neuralplatte können in verschiedenen physiologischen Phasen sein, da nicht alle Zellen in gleichem Masse angegriffen werden und schliesslich doch noch intakte Zellen zurückbleiben.

Die Gesamtheit der Ausfallserscheinungen, die mit MBA an verschieden alten Molchkeimen erzielt wurden, zeigt mancherlei verwandte Züge mit der Zell-Letalität der Amphibienkeime, die von Baltzer und Mitarbeitern sowie von Hadorn an bastardmerogonischen Keimen und an diploiden Bastarden gefunden wurden. So zerfallen nach Schönmann (1938) Keime von *Tr. taeniatus*, befruchtet mit Sperma von *Salamandra* zu Beginn der Gastrulation, ähnlich wie die Keime der Gruppe I nach MBA-Behandlung.

Bei den MBA-behandelten Keimen der Gruppe 2 und 3 ist eine spezifische Aehnlichkeit des Schädigungsmusters mit solchen bei kernletalen Keimen nicht in vollem Umfange nachzuweisen. Immerhin ist das Auftreten eines organspezifischen Schädigungsmusters bemerkenswert. In erster Linie werden die Zellen des Nervensystems letal. Hier besteht eine Analogie zu der von Hadorn untersuchten Kombination (haploider cristatus-Kern in palmatus-Plasma), bei der das Nervensystem hochgradig letal, die Chorda aber relativ unempfindlich ist. Die Epidermis ist beim Merogon wie beim MBA-Keim resistent. Das Verhalten des Herzens und der Blutzellen kann nicht verglichen werden, da die Keime Hadorns zu wenig lang lebten.

Es ist hier nicht der Ort auf einen eingehenden Vergleich der Schädigungsmuster einzutreten.

Zunächst mag festgehalten werden, dass es gelingt, mit der MBA-Behandlung von Molchkeimen Schädigungsmuster zu erzeugen, die mit den Schädigungsmustern disharmonischer Kernplasma-Kombinationen eine mehr oder weniger weitgehende Aehnlichkeit zeigen. Dieser Umstand verdient weitere Untersuchung.

SUMMARY

1. Egg of *Triton alpestris* and *Triton taeniatus* were treated with a chlorethylamine compound, the methyl-his-β-chlor-aethylamine (MBA) for half an hour in concentrations of 1-2-10^{-4} and 10^{-5} respectively.

2. One can distinguish three different phases in the early development *a)* early blastula till early gastrula with sickel-shaped blastopore; *b)* early gastrula till slit-blastopore stage, and *c)* slit-blastopore stage and older.

3. Treatment during the first phase causes a general blockage of development by a disintegration of the presumptive ecto- and mesoderm in a high percentage of the cases. A few eggs treated at an early gastrula stage developed further and showed more or less the type of development of the second group.

The second group shows a normal gastrulation and onset of neurulation. Then the greater parts of the presumptive neural plate and neural folds disintegrate, the necrotic cells of which penetrate into the underlying archenteron roof and accumulate in the blastocoelic cavity. The presumptive blood islands necrotise also at an early stage. The developing larvae show a very reduced nervous system and tail rudiment-except for the notochord-while all neural crest derivatives are also badly developed, e.g. external gills, internal gill arches, ganglia, connective tissue, dorsal and tail fin and the chromatophores. The heart remains very rudimentary, probably because of the absence of a blood circulation.

The third group does not show essential differences in comparison with the second group, only the period of latency lasts much longer: 4—6 days. In neurulae the same organ systems have been affected. At eye-cup and early tail bud stages the abnormalities diminish except for those of the eyes and the skin.

4. Treatment for longer periods or with a higher concentration causes an extension of the disintegrating area: the whole ectoderm becomes affected and also more lateral and dorsal parts of the mesoderm. The entoderm only remains intact.

5. The nervous system is reduced equally over its whole length without showing any regional preference. The MBA compound therefore affects a general process, a conclusion which is moreover supported by the fact that quite different organ systems as e.g. the blood islands and the nervous system are likewise affected.

6. The affected parts represent parts with a high mitotic activity and probably increased metabolism. According to Bodenstein and Kondritzer (1948) the MBA blocks the synthesis of the desoxyribonucleic acid without affecting the synthesis of the ribonucleic acid. The significance of these substances in the induction process and in the subsequent phase of organisation is shortly discussed.

7. The cell-lethal pattern caused by MBA treatment is compared with the cell-lethal patterns of amphibian embryos, which developed from hybrid diploid or merogonic eggs (Baltzer, Hadorn).

LITERATURVERZEICHNIS

1949. Baltzer, F. *Entwicklungsphysiologische Analyse von Artbastarden.* 13e Congr. international de Zool. (Paris).

1951. F. & Schönmann, W. *Ueber die Letalität des Bastards Triton palmatus* ♀ × *Salamandra atra* ♂. Rev. Suisse Zool. *58*: 495-502.

1947. Bodenstein, D. *The effects of nitrogen mustard on embryonic amphibian development.* I. *Ectodermal effects.* J. Exp. Zool. *104*: 311-312.

1948. —— *The effects of nitrogen mustard on embryonic amphibian development.* II. *Effects on eye development.* J. Exp. Zool. *108*: 93-126.

1948. —— & Goldin, A. *A comparison of the effects of various nitrogen mustard compounds on embryonic cells.* J. Exp. Zool. *108*: 75-92.

1948. —— & Kondritzer, A. A. *The effect of nitrogen mustard on nucleic acids during embryonic amphibian development.* J. Exp. Zool. *107*: 109-122.

1947. Brachet, J. *Nucleic acids in the cell and the embryo*. Symp. Soc. Exp. Biol. Nr. 1, 207-224.
1950. —— *The localization and the role of ribonucleic acid in the cell*. Ann. N.Y. Acad. Sci. *50*: 861-869.
1951. Bretscher, A. & Tschumi, P. *Gestufte Reduktion von chemisch behandelten Xenopus-Beinen*. Rev. Suisse Zool. *58*: 391-398.
1946. Gillette, R. & Bodenstein, D. *Specific developmental inhibitions in amphibian embryos by a nitrogen mustard compound*. J. Exp. Zool. *103*: 1-32.
1937. Hadorn, E. *Die entwicklungsphysiologische Auswirkung der disharmonischen Kern-Plasmakombination beim Bastardmerogon Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* ♂. Roux' Arch. *136*: 400-489.
1949. —— *Begriffe und Termini zur Systematik der Letalfaktoren*. Arch. Jul. Klaus-Stiftung *24*: 105-113 (1949).
1945. Lehmann, F. E. *Einführung in die physiologische Embryologie*. Birkhäuser, Basel.
1938. Schönmann, W. *Der diploide Bastard Triton palmatus* ♀ × *Salamandra* ♂. Roux' Arch. *138*: 345-375.